



Rec'd PCT/PTO 24 JUN 2005

10/540755

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

REC'D 14 MAY 2004

COPIE OFFICIELLE

WIPO PCT

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 23 JAN. 2004

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLESIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 • B / 210502

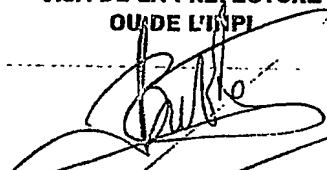
REMISE DES PIÈCES DATE 24 DEC 2002 LIEU 33 INPI BORDEAUX N° D'ENREGISTREMENT 0216629 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 24 DEC. 2002		Reservé à l'INPI <input checked="" type="checkbox"/> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE AQUINOV 12 rue Condorcet 33150 CENON	
Vos références pour ce dossier (facultatif) CAPTION.02			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/> N° _____ Date _____	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PROCEDE DE FABRICATION D'UN VECTEUR DE MOLECULES ACTIVES APPLICABLE DANS LE DOMAINE DE LA DIFFUSION DE PRINCIPES ACTIFS ET VECTEUR OBTENU			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ Date _____ N° _____ Pays ou organisation _____ Date _____ N° _____ Pays ou organisation _____ Date _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		GEMAC	
Prénoms			
Forme juridique		Société Anonyme à Directoire et Conseil de Surveillance	
N° SIREN		14 286 896 08	
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	12 rue Condorcet	
	Code postal et ville	33 315 01 CENON	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		FRANCAISE	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2^{ème} page

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES
DATE **24 DEC 2002**
LIEU **33 INPI BORDEAUX**
N° D'ENREGISTREMENT **0216629**
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 210502

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)			
Nom	POUCHUCQ		
Prénom	Bernard		
Cabinet ou Société	AQUINOV		
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel	----		
Adresse	Rue	12 rue Condorcet	
	Code postal et ville	33 31 15 10 CENON	
	Pays	FRANCE	
N° de téléphone (facultatif)	05.57.54.47.15		
N° de télécopie (facultatif)	05.56.32.83.10		
Adresse électronique (facultatif)	aquinov@wanadoo.fr		
7 INVENTEUR (S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transmutation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG <input type="text"/>	
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE - (Nom et qualité du signataire) B. POUCHUCQ CPI 92-1204		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 	

**PROCEDE DE FABRICATION D'UN VECTEUR DE MOLECULES ACTIVES
APPLICABLE DANS LE DOMAINE DE LA DIFFUSION DE PRINCIPES
ACTIFS ET VECTEUR OBTENU**

La présente invention concerne un procédé de fabrication d'un vecteur de molécules actives, applicable dans le domaine biomédical pour la diffusion de principes actifs.

Un tel vecteur est applicable à la diffusion de principes actifs dans les domaines
5 humain, animal et végétal.

L'invention couvre aussi le vecteur biomédical issu de ce procédé.

Dans le domaine du traitement du corps humain ou du traitement des végétaux, par exemple, on sait que certains principes actifs sont métabolisés prématurément avant d'avoir atteint leur cible.

10 Aussi afin que certaines molécules puissent présenter une activité thérapeutique suffisante, il faut greffer ces molécules sur des vecteurs.

On peut citer comme molécules actives intéressant la présente invention et données à titre d'exemples des acides gras, des antioxydants, des hormones, des composés vitaminés, des médicaments ou des neurotransmetteurs.

15 De telles molécules actives, présentées par un vecteur disposent d'activités bactériostatiques, anti-allergisantes, anti-parasitaires, anti-prédateurs ou anti-fongiques, immunomodulantes ou anti-inflammatoires.

Une molécule de petite taille diffuse rapidement mais elle est rapidement métabolisée tandis que la même molécule greffée aura une durée de vie plus
20 longue car elle ne sera pas aussi rapidement métabolisée.

La diffusion d'une molécule active greffée sur un vecteur adapté augmente ce qui permet de faire migrer le principe actif plus proche du lieu d'action avant qu'il ne soit métabolisé, et avec une forte action.

Le but est donc de pouvoir utiliser des vecteurs avec leurs molécules greffées,
5 suffisamment importants en taille afin d'obtenir une forte efficacité mais de les greffer sur des vecteurs qui leur assurent aussi une forte diffusibilité.

Il est un autre paramètre important c'est la capacité pour le vecteur de recevoir par greffage ces molécules actives.

C'est l'objet de la présente invention de permettre la réalisation d'un vecteur du
10 type polymère qui assure ce rôle de support de molécule active avec une forte diffusibilité. Plus particulièrement, en modifiant le taux de polymérisation, on peut ajuster cette diffusibilité.

La présente invention propose aussi un procédé permettant de réaliser un vecteur de molécules actives sous forme d'un polymère ne nécessitant aucun
15 support inerte.

Ce même vecteur peut aussi piéger les métaux lourds et les composés ayant un métal accroché à une protéine inductrice de réponses immunes comme le sérum albumine bovine.

On connaît des techniques notamment décrites dans la demande de brevet
20 PCT/FR99/00103 permettant d'obtenir des polymères à partir d'amines.

On recourt pour cela à des diamines que l'on polymérise en présence d'un agent réticulant.

Dans ces procédés connus, les polyamines sont la poly(L-ornithine-R), la poly(putrécine-R), la poly(cadavérine-R), la poly(L-carnosine-R), la
25 poly(spermidine-R) ou la poly(spermine-R) ou encore un mélange de celles-ci. -R représente l'agent polymérisant réduit au borohydride de sodium.

Les agents de réticulation utilisés sont choisis parmi le formaldéhyde, le glyoxal, le malondialdéhyde bien que d'un prix de revient très élevé, ou le glutaraldéhyde.

Un autre agent est le 1,1,3,3-tétraméthoxypropane.

Le procédé de polymérisation utilisé consiste en une dissolution de la diamine dans une solution basique, au-delà de pH 8,0 et en un ajout de glutaraldéhyde.

La réduction des doubles liaisons est obtenue également par une solution de borohydrure de sodium, suivie d'une série de dialyses.

On obtient ainsi un rendement de polymérisation classé dans l'ordre suivant :

poly(putrécine-G) > poly(cadavérine-G) > poly(L-ornithine-G) > poly(spermidine-G) > poly(L-carnosine-G).

Dans ces composés , -G représente le glutaraldéhyde réduit au borohydrure de sodium.

Si l'on connaît bien les couplages des amines réalisés au moyen du glutaraldéhyde on ne connaît pas de polymères réalisés avec le glutaraldéhyde.

Le problème soulevé par ces polymères lorsqu'ils sont utilisés pour le traitement de fluides, est la nécessité de travailler en milieu fortement alcalin au-delà de pH 8,0. La poly(putrécine-G) et, la poly(L-carnosine-G) ne peuvent être polymérisées à des pH inférieurs à 8,0.

De tels polymères sont également très intéressants car il est possible de générer des polymères tridimensionnels.

Pour réaliser un vecteur biomédical, il n'est pas concevable de travailler à un pH autre que proche du neutre à 7,0, celui du corps humain en l'occurrence. Il en est de même également pour le règne végétal dans la plupart des cas.

La présente invention vise donc à déterminer un procédé permettant de générer des polymères, bi ou mieux tridimensionnels, à partir d'une diamine mais qui travaillent à pH neutre ou proche de cette valeur de 7,0.

Les avantages nombreux du produit selon la présente invention seront révélés à la lecture de la description qui va suivre.

Ce procédé est maintenant décrit en détail suivant un mode de réalisation particulier, non limitatif.

Le procédé consiste à recourir à une diamine la L-ornithine et à la polymériser en présence d'un composé de la famille des dialdéhydes, plus particulièrement le glutaraldéhyde pour obtenir une homopolyamine, la poly(L-ornithine-G).

On peut réaliser le même procédé avec d'autres diamines, même si les rendements sont plus faibles car dans le domaine du biomédical, les quantités nécessaires sont plus faibles. On peut citer ainsi la D ou L-citrulline et la L-lysine.

La description de ce premier mode de réalisation préférentiel se limite à la L-ornithine.

10 Ce monomère comprend quatre carbones et deux groupes NH_2 . Il faut en effet que les deux groupes NH_2 soient séparés par au moins quatre carbones. On note que des essais avec des molécules ayant trois carbones ne donnent pas satisfaction car il n'y a pas de polymérisation possible.

Dans ce cas de la L-ornithine, il est possible de réaliser non seulement un homopolymère linéaire mais aussi un homopolymère en 3D moyennant un réticulant pour former ainsi un réseau.

L'homopolyamine L-ornithine-G ainsi réalisée est nouvelle et particulièrement inventive dans sa fonction de vecteur de molécules actives, plus particulièrement sous sa forme tridimensionnelle.

20 Le procédé de réalisation de l'homopolyamine L-ornithine-G selon la présente invention consiste à mélanger :

- la L-ornithine par exemple 10g dans 25 ml d'eau avec ajustement à un pH compris entre 6,5 et 7,5, plus particulièrement 7,0.

$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$,

25 - du glutaraldéhyde, 20 ml à 50%.

$\text{OHC}-(\text{CH}_2)_3-\text{COH}$.

La réaction qui se produit est une réaction de polycondensation avec formation d'imines.

On obtient un polymère linéaire qui peut être utilisé moyennant le passage à travers un système de dialyse.

Afin d'obtenir directement un polymère en 3D, selon le procédé de la présente invention, on assure une réticulation de ce polymère en ajoutant au milieu un réticulant tel du polyéthylène imine. L'ajout est effectué dans des proportions de 1 ml pour 10 g d'ornithine, dans le cas présent.

Le polymère obtenu se présente bien sous la forme d'un polymère tridimensionnel.

Pour réaliser des perles de l'homopolymère obtenu et le rendre encore plus aisément manipulable, on l'introduit dans un milieu organique hydrophobe pour obtenir un effet biphasique. De plus, avantageusement ce milieu est chauffé pour diminuer encore le temps de la polymérisation de l'homopolymère qui devient quasi instantanée.

Pour collecter les perles ainsi formées, on les retient tout simplement mécaniquement sur un filtre puis on les sèche sous ventilation chauffante pour éliminer l'eau d'une part et pour finaliser la réticulation d'autre part.

Ces billes sont ensuite dégraissées puis traitées au moins une fois à la soude par exemple dans 200 ml de soude à 1M à 80°C pendant deux heures.

Cette étape permet de retirer les protons sinon il se produirait une formation d'hydrogène et un éclatement mécanique des perles, les rendant impropres à une manipulation aisée.

Cette étape peut être renouvelée au moins un fois.

On peut ainsi éviter de consommer inutilement du borohydrure de sodium puisque les perles sont ensuite placées dans une solution de soude à 1M en présence de 1g/l de borohydrure de sodium pour réduire les doubles liaisons des imines formées.

Les perles obtenues sont rincées sur eau et sur acide chlorhydrique à 0,001M pour neutraliser les éventuelles traces alcalines puis rincées abondamment sur eau.

On obtient alors des perles d'homopolymère L-ornithine-G susceptibles de servir de vecteur de molécules actives, avec une forte efficacité. On constate aussi qu'il est possible de choisir en fonction du degré de réticulation la taille du vecteur et donc la diffusibilité.

Comme exemple de molécules de petites taille susceptibles d'être greffées sur la poly(ornithine-G), on peut citer les exemples suivants :

10

MOLECULES	COUPLAGES REALISES	CONCENTRATION (M)
Acide palmitique	Ac palmitique-poly(ornithine-G)	$2,05 \cdot 10^{-3}$
Acide myristique	Ac myristique-poly(ornithine-G)	$2,26 \cdot 10^{-3}$
Acide oléique	Ac oléique-poly(ornithine-G)	$1,96 \cdot 10^{-3}$
Taurine-AG	Taurine-Ag-poly(ornithine-G)	$3,92 \cdot 10^{-3}$

L'homopolyamine poly(L-ornithine-G) obtenue par le procédé selon la présente invention, sur laquelle sont greffés des acides gras, est également testée du point de vue de la toxicité et des tests de base ont montré une non toxicité.

15 Ces tests consistent à administrer à des rats mâles des solutions de poly(L-ornithine-G) greffée avec des acides gras à 1 mg/ml à la dose de 0,5 ml/j.

On constate une augmentation significative du poids au cours des 150 jours qui suivent. On a représenté les courbes en annexe sur les figures 1 et 2.

Si l'on compare avec la L-citrulline ou la L-lysine, on constate que lors de la polymérisation, le rendement est beaucoup moins élevé, mais on obtient une polymérisation en poly(citrulline-G) et en poly(lysine-G) avec possibilité de réaliser un polymère tridimensionnel.

20

Dans un test comparatif, on dispose de 100 mg de L-ornithine et de 100 mg de D, L-citrulline que l'on place en présence de 3 ml d'acétate 3M, 1 ml d'eau et 3 ml de glutaraldéhyde à 5%.

Les valeurs du poids de polymères, atteintes après lyophilisation sont
5 respectivement de 23,2 mg de poly(ornithine-G) et de 7,2 mg de poly(citrulline-G).

Ceci est essentiellement dû au groupement CONH_2 qui diminue la disponibilité pour la polymérisation du groupement NH_2 .

La poly(ornithine-G) sur laquelle sont greffés des acides gras par liaison amide a
10 été évaluée du point de vue de son activité biologique dans des modèles animaux expérimentaux d'affections chroniques.

Sur le modèle d'encéphalite expérimentale, ce polymère greffé avec des acides gras en concentration de $4 \text{ à } 5 \cdot 10^{-5}$ moles a montré une activité biologique par
15 diminution importante de la crise (équivalente à une poussée de sclérose en plaques).

REVENDEICATIONS

1. Procédé de fabrication d'un vecteur de molécules actives applicable dans le domaine biomédical, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
 - diluer un monomère ayant au moins deux groupements NH_2 séparés par au moins quatre carbones dans l'eau,
 - 5 - ajuster le pH à une valeur comprise entre 6,5 et 7,5.
 - ajouter du glutaraldéhyde, $\text{OHC}-(\text{CH}_2)_3-\text{COH}$, et
 - attendre la réaction de polycondensation et la formation d'imines, et
 - récupérer le poly(monomère-G) obtenu.
 2. Procédé de fabrication d'un vecteur de molécules actives applicable dans le
10 domaine biomédical, caractérisé en ce que le monomère est la L-ornithine, la L-lysine ou la L-citruline pour obtenir la formation de la poly(L-ornithine-G), poly(L-lysine-G), poly(L-citruline-G),
 3. Procédé de fabrication d'un vecteur de molécules applicable dans le domaine biomédical selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le polymère
15 obtenu est linéaire.
 4. Procédé de fabrication d'un vecteur de molécules applicable dans le domaine biomédical selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'on ajoute un réticulant pour obtenir un réseau de poly(L-ornithine-G), poly(L-lysine-G), poly(L-citruline-G) en 3D,.....
 - 20 5. Procédé de fabrication d'un vecteur de molécules applicable dans le domaine biomédical selon la revendication 4, caractérisé en ce que le réticulant est le polyéthylène imine.
 6. Procédé de fabrication d'un vecteur de molécules applicable dans le domaine biomédical selon la revendication 4 ou 5, caractérisé en ce que l'on disperse
25 l'homopolymère obtenu dans un milieu organique hydrophobe pour obtenir un
-
-

effet biphasique pour réaliser des perles de poly(L-ornithine-G), de poly(L-lysine-G) ou de poly(L-citruline-G).

7. Procédé de fabrication d'un vecteur de molécules applicable dans le domaine biomédical selon la revendication 6, caractérisé en ce que, pour collecter les
5 perles ainsi formées, on les retient mécaniquement sur un filtre puis on les sèche sous ventilation chauffante.

8. Procédé de fabrication d'un vecteur de molécules applicable dans le domaine biomédical selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce que l'on procède à un chauffage du milieu organique hydrophobe utilisé.

10 9. Procédé de fabrication d'un vecteur de molécules applicable dans le domaine du traitement de l'eau selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que, pour réduire les doubles liaisons des imines et obtenir des amines, on procède aux opérations suivantes :

- dégraissage du polymère obtenu en sortie de réaction de condensation,
- 15 - traitement au moins une fois à la soude, et
- mise en présence de ce polymère en présence de borohydrure de sodium.

10. Vecteur de molécules applicable dans le domaine biomédical, caractérisé en ce qu'il comprend de la poly(ornithine-G), de la poly(L-lysine-G) ou de la poly(L-citruline-G) sur laquelle sont greffées des molécules actives telles que des
20 acides gras, des antioxydants, des composés vitaminés, des hormones, des médicaments ou des neurotransmetteurs pour disposer d'activités bactériostatiques, anti-allergisantes, anti-parasitaires, anti-prédateurs, anti-fongiques, anti-inflammatoires ou immunomodulantes.

11. Utilisation du vecteur de la revendication 10, obtenu suivant le procédé de
25 l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il est utilisé pour recevoir des acides gras, des antioxydants, des composés vitaminés ou des neurotransmetteurs pour disposer d'activités bactériostatiques, anti-

allergisantes, anti-parasitaires, anti-prédateurs, anti-fongiques, anti-inflammatoires ou immunomodulantes.

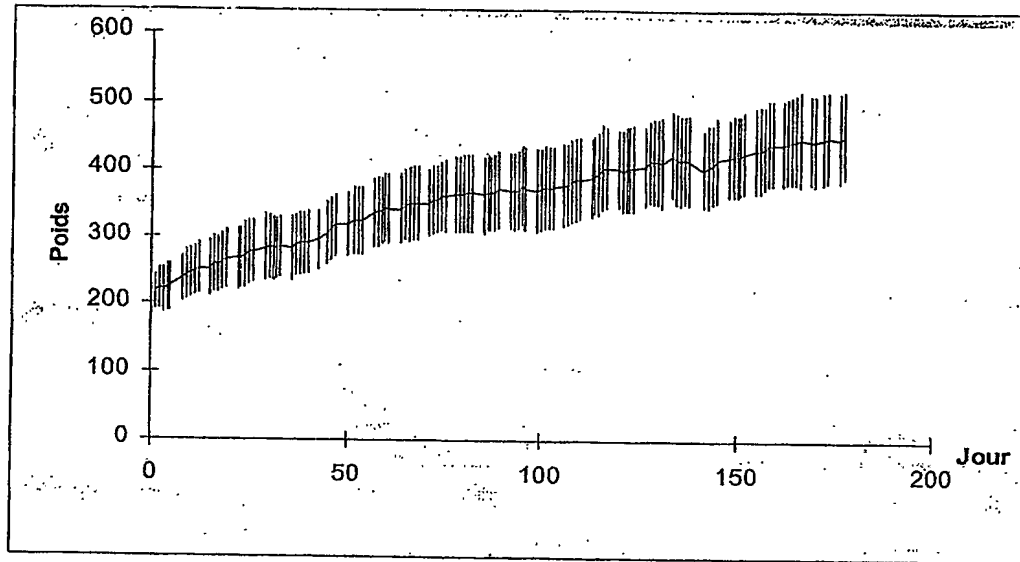


Figure 1

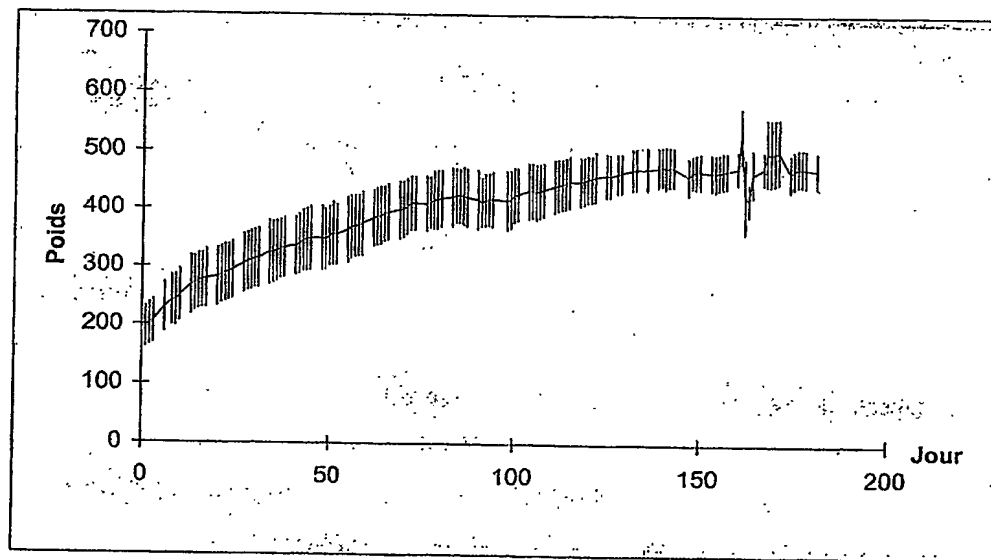


Figure 2

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1../1..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		CAPTION.02
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02/16629
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
PROCÉDE DE FABRICATION D'UN VECTEUR DE MOLECULES ACTIVES APPLICABLE DANS LE DOMAINE DE LA DIFFUSION DE PRINCIPES ACTIFS ET VECTEUR OBTENU		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
GEMAC 12 rue Condorcet 33150 CENON		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1	Nom	GEFFARD
	Prénoms	Philippe
Adresse	Rue	36 route de Cadillac
	Code postal et ville	33 355 0 LANGOIRAN
Société d'appartenance (facultatif)		
2	Nom	GEFFARD
	Prénoms	Michel
Adresse	Rue	200 avenue de Thouars
	Code postal et ville	33 340 0 TALENCE
Société d'appartenance (facultatif)		
3	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
B. POUCHUCQ CPI 92-1204		